



CL  
E 90  
**12<sup>A</sup> Terinzagelegging 11 8901258**

Nederland

19 NL

- 54 5-Halogeno-2',3'-dideoxycytidinederivaten in geneesmiddelen voor het behandelen van retrovirus-infecties.
- 51 Int.Cl<sup>9</sup>: C07H 19/06, A61K 31/70.
- 71 Aanvrager: Stichting Rega V.Z.W. te Leuven, België.
- 74 Gem.: Ir. R. Hoijsink c.s.  
Octrooibureau Arnold & Siedsma  
Sweelinckplein 1  
2517 CK 's-Gravenhage.

21 Aanvraag Nr. 8901258.

22 Ingediend 19 mei 1989.

32 --

33 --

31 --

62 --

43 Ter inzage gelegd 17 december 1990.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

BEST AVAILABLE COPY

5-Halogeno-2',3'-dideoxycytidinederivaten in geneesmiddelen  
voor het behandelen van retrovirus-infecties.

De uitvinding betreft nieuwe dideoxycytidine derivaten en hun toepassing in een therapeutisch middel voor het behandelen van retrovirus-infecties zoals AIDS en met AIDS verwante ziekten.

5 AIDS of verworven immunodeficientiesyndroom is een pandemische immunosuppressieve ziekte, die het gevolg is van een uitputting aan helper T-lymfocyt cellen in het menselijk lichaam. De veroorzaker is geïdentificeerd als een retrovirus en wordt "humaan immunodeficiëntievirus" oftewel HIV ge-  
10 noemd. Op het moment zijn twee verschillende typen (HIV-1 en HIV-2) van dat retrovirus beschreven; beide typen kunnen AIDS of met AIDS-verwante ziekten opwekken, ofschoon HIV-1 wijder verspreid is dan HIV-2.

Vele pogingen tot het vinden van geschikte anti-HIV  
15 middelen zijn reeds in het werk gesteld en van vele stoffen en verbindingen is gerapporteerd dat zij de replicatie van HIV (doorgaans type 1) in vitro tegengaan. Voor een overzicht zie E. De Clercq, Anticancer Res., 7, 1023-1038 (1987).

Onder de voorgestelde anti-HIV verbindingen is  
20 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (azidothymidine of AZT) op het moment de enige verbinding die klinisch bruikbaar is gebleken bij het behandelen van AIDS-patiënten, vergelijk Fischl et al, New Engl.J.Med. 317, 185-191 (1987).

Bij proeven in vitro is naast 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine ook 3'-fluor-2',3'-dideoxythymidine een krachtige inhibitor van de HIV-replicatie gebleken, vergelijk Balzarini et al, Biochemical Pharmacology, 37, 2847-2856  
25 (1988). Verder vindt men een krachtige anti-HIV werking bij 5-chloor-3'-azido- en 5-chloor-3'-fluor-derivaten van 2',3'-  
30 dideoxyuridine, vergelijk Balzarini et al, Biochemical Pharm., 39, 869-894 (1989).

In de cytidinereeks blijkt 2',3'-dideoxycytidine een krachtige anti-HIV inhibitor te zijn, evenals het 2',3'-didehydroderivaat daarvan, terwijl de 3'-azido- en 3'-fluor-derivaten daarvan minder krachtig werkzaam zijn, vergelijk 5 Balzarini et al, l.c., 1988.

Bij voortgezet onderzoek is thans gevonden dat 5-halogeno-3'-azido-, 5-halogeno-3'-fluor- en 5-halogeno-2',3'-didehydro-derivaten van 2',3'-dideoxycytidine een krachtige en selectieve anti-HIV werking hebben, welke met 10 die van 2',3'-dideoxycytidine vergelijkbaar is. Dit betekent dat de genoemde verbindi gen met voordeel kunnen worden gebruikt in farmaceutische preparaten tegen AIDS en met AIDS verwante ziekten, en in het algemeen in farmaceutische prepa-  
raten tegen retrovirus-infecties met inbegrip van hepatitis 15 B.

De 5-halogeno-3'-azido-, 5-halogeno-3'-fluor- en 5-halogeno-2',3'-didehydro-derivaten van 2',3'-dideoxycytidi-  
ne zijn nieuwe stoffen die langs elke gebruikelijke route voor nucleoside-analogen kunnen worden gesynthetiseerd. Bij 20 voorkeur wordt eerst een corresponderend 2',3'-dideoxyuridi-  
nederivaat gemaakt, dat dan met een bekende methode in een 2',3'-dideoxycytidine derivaat wordt omgezet. Het halogeen-  
atoom op de 5-plaats wordt bij voorkeur eerst ingevoerd als de substituent op de 3'-plaats reeds aanwezig is.

25 Opgemerkt wordt dat onder "halogeno" zowel chloro, bromo, iodo als fluoro wordt verstaan. Momenteel geniet chloro de voorkeur.

Thans volgen enkele voorbeelden voor de synthese van de stoffen volgens de uitvinding.

30 Synthese voorbeeld 1

5-chloro-3'-azido-2',3'-dideoxycytidine.

2,6 g (4,95 mmol) 5'-O-monomethoxytrityl-3'-azido-2',3'-dide-  
oxyuridine werd omgezet met 1,0 g (7,5 mmol) N-chloorsuccini-  
mide in 100 ml pyridine. Door opwerken en chromatografische  
35 zuivering werd 2,52 g (4,5 mmol, 91%) van een lichtbruin  
schuim verkregen, dat tezamen met watervrij pyridine werd

89 0 2 5 6 .

verdampt en opgelost in 50 ml dichloorethaan-pyridine (5:1). Aan de gekoelde oplossing (0°C) werd in 20 minuten 20 ml 10%'s oplossing var. trifluormethaansulfonzuuranhydride in 1,2-dichloorethaan toegedruppeld. Na drie uren bij kamertem-  
 5 peratuur was blijkens TLC (CHCl<sub>3</sub>-MeOH 95:5) het uitgangsmate-  
 riaal volledig omgezet. Het mengsel werd in 200 ml met ammo-  
 niak verzadigde methanol gegoten. De oplossing werd een nacht  
 bij kamertemperatuur doorgeroerd, waarop blijkens TLC naast  
 het uitgangsmateriaal een nieuw produkt in nagenoeg gelijke  
 10 hoeveelheden aanwezig was. Na concentratie werd het residu  
 opgelost in ethylacetaat en gewassen met water en met pekkel.  
 De organische laag werd gedroogd, drooggedampt en gezuiverd  
 waardoor 1,00 g (1,78 mmol, 40%) teruggewonnen 5-chloro-5'-  
 O-monomethoxytrityl-3'-azido-2',3'-dideoxyuridine en 1,26 g  
 15 (2,25 mmol, 50%) 5-chloro-5'-O-monomethoxytrityl-3'-azido-  
 2',3'-dideoxycytidine als schuim werd verkregen. UV (MeOH)  
 $\lambda_{\max}$  288 nm. Dit schuim werd 30 minuten bij 60°C behandeld  
 met 100 ml 80%'s azijnzuur. Na adsorptie op silicagel werd  
 het mengsel gezuiverd (CHCl<sub>3</sub> tot CHCl<sub>3</sub>-MeOH 94:6) waardoor  
 20 380 mg (1,32 mmol) van een lichtgeel schuim werd verkregen  
 dat kristalliseerde uit MeOH-diethylether. Opbrengst 221 mg  
 (0,77 mmol, 34%), smp.: 173-175°C (dec).

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  289 nm (ε = 2300),  $\lambda_{\min}$  264 nm.  
 MS, m/z 286 (S, M), 142 (45, S+2H), 145 (100, B+H), 142 (9, S), 110 (27,  
 25 B+H-Cl).  
<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 2.34 (s, H-2', H-2''), 3.67 (m, H-5', H-5''), 3.86 (m,  
 H-3'), 4.37 (q, J = 5.5 Hz, H-4'), 5.32 (br, 5'-OH), 6.03 (t, J = 5 Hz,  
 H-1'), 7.20 (br) and 7.83 (br) (NH<sub>2</sub>), 8.20 (s, H-6) ppm.  
<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 37.3 (C-2'), 59.5 (C-3'), 60.4 (C-5'), 84.5 and 85.7  
 30 (C-1', C-4'), 99.2 (C-5), 139.2 (C-6), 153.6 (C-2), 161.5 (C-4) ppm.  
 Anal. (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) C, H, N.

### Synthese voorbeeld 2

5-chloro-3'-fluor-2',3'-dideoxycytidine  
 760 mg (2,47 mmol) 5-chloro-5'-O-acetyl-3'-fluor-2',3'-dide-

690256.

oxyuridine werd opgelost in 24 ml dichloorethaan-pyridine (5:1) en gekoeld in een ijs-zoutbad. In 10 minuten werd 10 ml 10%'s oplossing van trifluormethaansulfonzuur anhydride in dichloorethaan toegedruppeld, waarna het mengsel 3 uren bij 5 omgevingstemperatuur werd doorgeroerd. Blijkens TLC (CHCl<sub>3</sub>-MeOH 95:5) was het uitgangsmateriaal volledig omgezet. De inhoud werd uitgegoten in 100 ml met ammoniak verzadigde methanol en 15 uren doorgeroerd. Daarna waren blijkens TLC (CHCl<sub>3</sub>-MeOH 9:1) twee nucleosidische produkten aanwezig waar- 10 van het snelst bewegende produkt gezamenlijk migreerde met het gedeacyleerde uitgangsmateriaal. Door flits-chromatografische zuivering (CHCl<sub>3</sub>-MeOH 97:3 tot 9:1) werd 286 mg (1,08 mmol, 43%) 5-chloro-3'-fluor-2',3'-dideoxyuridine teruggewonnen en 600 mg onzuiver bruin schuim verkregen. Na intensieve zuive- 15 ring werd 148 mg (0,46 mmol, 22%) van de titelverbinding geïsoleerd als een wit schuim dat kristalliseerde uit MeOH-aceton. Smp.: 179-180°C.

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  268 nm ( $\epsilon = 6700$ ),  $\lambda_{\min}$  285 nm.  
 20 MS,  $m/z$  265 (15, M), 146 (34, B+2H), 145 (100, B+H), 119 (13, S), 118 (30, B+H-Cl).  
<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.00-1.60 (m, H-2', H-3', partially hidden by DMSO), 3.63 (d, J = 3.5 Hz, H-5', H-5''), 4.20 (dt, J = 3.5 Hz, J<sub>4',F</sub> = 27.3 Hz, H-4'), 5.21 (dd, J = 5.7 and 2.5 Hz, H-1'), 7.26 (br) and 7.90 (br) (NH<sub>2</sub>), 8.11 (s, H-6) ppm.  
 25 <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 35.3 (J = 20 Hz, C-2'), 60.9 (J = 11 Hz, C-5'), 85.2 (J = 23.2 Hz, C-4'), 85.5 (C-1'), 95.0 (J = 173.3 Hz, C-3'), 99.4 (C-5), 139.1 (C-4), 150.5 (C-2), 161.4 (C-4) ppm.  
 Anal. (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>ClFNO<sub>3</sub>) C, H, N.

30

### Synthesevoorbeeld 3

#### 5-chloro-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxycytidine.

1,46 g (5,46 mmol) 5'-O-propionyl-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyuridine werd in een opbrengst van 81% omgezet tot 5'-O-propionyl-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxycytidine met behulp van triazool en 0-chloorphenyl dichloorfosfaat, volgens de

8801118.

methode van Sung voor omzetting van uridine- tot cytidine derivaten. Vergelijk W.L. Sung, J. Org. Chem. 47, 3623-3628 (1982).

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  271 en 237 nm.

- 5            Reactie met benzoëzuuranhydride in watervrij pyridine gaf het N-gebenzoyleerde produkt in 93% opbrengst. UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  261 en 304 nm.

Het beschermde nucleoside-analoog werd in pyridine 30 minuten bij 100°C behandeld met 1,5 equivalenten N-chloro-  
10 succinimide. Intensieve opwerking leverde 38% van het 5-chloorprodukt naast 21% teruggewonnen materiaal.

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  261 en 331 nm.

Deprotectie met methanol, verzadigd met ammoniak, leverde tenslotte 62% van het titelprodukt dat kristalliseerde uit methanol-diethylether. Smp.: 144-145°C.

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  288 nm ( $\epsilon = 6760$ ),  $\lambda_{\min}$  267 nm.

MS,  $m/z$  243 (2, M<sup>+</sup>), 145 (17, B-H), 110 (100, B+H-Cl), 98 (48, S-H).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 3.15 (d, J = 11.6 Hz after exchange with D<sub>2</sub>O, H-3', H-5'), 4.81 (m, H-4'), 5.07 (t, J = 5Hz, S'-OH), 5.91 (dm, J<sub>2',3'</sub> = 3.7 Hz, H-3'), 5.34 (dm, J<sub>2',3'</sub> = 3.7 Hz, H-2'), 6.34 (m, H-1'), 7.21 (br) and 7.84 (br) (NH<sub>2</sub>), 8.14 (s, H-6) ppm.

20            <sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 61.9 (C-5'), 87.4 (C-4'), 99.2 (C-1'), 99.0 (C-5), 126.7 (C-3'), 134.1 (C-2'), 140.1 (C-6), 153.9 (C-2), 161.5 (C-4) ppm.

Anal. (C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) C, H, N.

25

Bij proeven die tot de uitvinding leidden, werd gevonden dat de verbindingen uit de synthesevoorbeelden 1, 2 en 3 in staat zijn de cytopathogeniciteit van HIV-1 in MT-4 cellen te remmen in een 50% effectieve dosis (ED<sub>50</sub>) van  
30 resp. 9 $\mu$ M, 14 $\mu$ M en 15 $\mu$ M. Ze zijn nagenoeg even actief tegen de replicatie van HIV-2. Bovendien zijn de verbindingen van synthesevoorbeeld 1 en 2 nauwelijks giftig voor de MT-4 cellen, zodat zij een hoge selectiviteitsindex hebben, evengoed of zelfs beter dan die van 2',3'-dideoxycytidine.

35

Bij onderzoek naar het vermogen om de door Moloney murine sarcoma virus (MSV) opgewekte transformatie van murine C3H/3T3 fibroblasten tegen te gaan, bleek geen van de deriva-

00000000.

ten uit de synthesevoorbeelden enige antivirale activiteit te vertonen bij concentraties tot 1000 $\mu$ M. Dit in tegenstelling tot azidothymidine dat een doeltreffende inhibitor van het MSV is ( $ED_{50}=0,027\mu$ M) en tot 2',3'-dideoxycytidine dat een  $ED_{50}$  van 10 $\mu$ M heeft. Niettemin wordt aangenomen dat de genoemde derivaten voldoende antivirale activiteit hebben tegen menselijke retrovirussen die menselijke cellen infecteren.

Op grond van deze gegevens zijn de genoemde verbindingen bruikbaar in geneesmiddelen tegen AIDS en met AIDS verwante ziekten en in het algemeen in geneesmiddelen tegen retrovirusinfecties met inbegrip van hepatitis B.

Therapeutische preparaten die de verbindingen volgens de uitvinding als actief bestanddeel voor het behandelen van retrovirusinfecties zoals AIDS of met AIDS verwante ziekten in de humane praktijk bevatten, kunnen de vorm hebben van poeders, suspensies, oplossingen, sprays, emulsies, zalven of crèmes en kunnen worden gebruikt voor locale toediening voor intranasale, rectale, vaginale en ook voor orale of parenterale (intraveneuze, intradermale, intramusculaire, intrathecale etc.) toediening. Dergelijke preparaten kunnen worden bereid door de actieve verbindingen te combineren (bijv. door mengen, oplossen etc.) met pharmaceutisch aanvaardbare excipientia van neutrale aard (zoals waterige of niet-waterige oplosmiddelen, stabilisatoren, emulgatoren, detergentia, additieven) en verder desgewenst met kleur- en geurstoffen. De concentratie van het actieve bestanddeel in het therapeutische preparaat kan sterk variëren tussen 0,1% en 100% afhankelijk van de wijze van toediening. Verder kan de dosis van het toe te dienen actieve bestanddeel variëren tussen 0,1 mg en 100 mg per kilogram lichaamsgewicht.

De anti-HIV eigenschappen van de 5-halogeno-2',3'-dideoxycytidinederivaten volgens de uitvinding worden gedocumenteerd door de volgende voorbeelden die niet in beperkende zin dienen te worden gelezen. Daarin worden 2',3'-dideoxycytidine en 3'azido-2',3'-dideoxythymidine ter vergelijking gebruikt.

De in de voorbeelden gebruikte virussen waren HIV-1 en HIV-2, resp. verkregen uit de kweekvloei-  
dend met HIV-1 geïnfecteerde H9 cellen en uit de kweekvloei-  
stof van aanhoudend met HIV-2 geïnfecteerde CEM cellen. Ver-  
5 der werd gebruik gemaakt van Moloney murine sarcoma virus  
(MSV), bereid uit tumoren die opgewekt waren door infectie in  
vivo van drie dagen oude NMRI-muizen (vergelijk De Clercq et  
al, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 137, 590-594, 1971).

De in de voorbeelden gebruikte cellen waren MT-4  
10 cellen zoals beschreven door I. Miyoshi et al, Gann Monogr.  
28, 219-218 (1982). Deze cellen werden gekweekt in een cul-  
tuurmedium bestaande uit RPMI-1640 medium, gesupplementeerd  
met 20 mM Hepes buffer, 10% (v/v) geïnactiveerd foetaal kal-  
verserum en 2 mM glutamine. Dit RPMI-1640 medium is een  
15 standaardmedium dat anorganische zouten zoals NaCl, NaHCO<sub>3</sub>,  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> etc., alsmede glucose, diverse aminozuren en diverse  
vitaminen bevat.

Vijf verschillende stoffen werden als testverbin-  
dingen gebruikt, nl:

- 20 AzddClCyd: 5-chloro-3'-azido-2',3'-dideoxycytidine,  
FddClCyd: 5-chloro-3'-fluor-2',3'-dideoxycytidine,  
D4ClC: 5-chloro-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxycytidine,  
ddCyd: 2',3'-dideoxycytidine,  
AzddThd: 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine.

25

#### Voorbeeld 1

Remming van de cytopathogene werking van HIV-1.

De testverbindingen werden gewaardeerd op hun rem-  
mend effect op de cytopathogene werking van HIV-1 in MT-4  
30 cellen.

In een eerste reeks proeven werden MT-4 cellen  
(5x10<sup>5</sup> cellen/ml) gesuspenseerd in een vers kweekmedium  
bestaande uit RPMI-1640 medium met naast de genoemde toevoe-  
gingen nog 0,075% (w/v) NaHCO<sub>3</sub>, 2,5 µg/ml Fungizone (Squibb  
35 N.V.). De suspensie werd geïnfecteerd met 200 CCID<sub>50</sub> aan  
HIV-1 per ml celsuspensie (1 CCID<sub>50</sub> is de infectieve dosis  
voor 50% van de celkweek). Onmiddellijk na het infecteren

2500000.



werden 100 µl porties van de celsuspensie in de holtes van een testplaat samengebracht met 100 µl porties van geschikte verdunningen van de testverbindingen. Elke holte van 200 µl bevatte zodoende 20 CCID<sub>50</sub> aan HIV en  $5 \times 10^4$  MT-4 cellen. Na vijf dagen incuberen bij 37°C in een vochtige atmosfeer met beheersing van het CO<sub>2</sub>-gehalte werd het aantal levensvatbare cellen geteld.

Een tweede reeks proeven, parallel aan de eerste, werd uitgevoerd met niet-geïnfecteerde celculturen, die in tegenwoordigheid van verschillende concentraties van de testverbindingen werden geïncubeerd. Ook hier werd na afloop het aantal levensvatbare cellen geteld. Uit de gevonden waarden werden de 50% effectieve dosis (ED<sub>50</sub>) en de 50% cytotoxische dosis (CD<sub>50</sub>) berekend, dat wil zeggen de concentraties aan testverbinding die nodig waren om het aantal levensvatbare cellen in de met virus geïnfecteerde, resp. de niet-geïnfecteerde celkweken met 50% te verminderen.

De resultaten zijn weergegeven in tabel 1.

Verbinding	ED <sub>50</sub>	CD <sub>50</sub>
AzddClCyd	9	923
FddClCyd	14	1000
D4ClC	15	170
ddCyd	0,27	39
AzddThd	0,002	5,2

Uit de tabel blijkt dat de drie verbindingen uit de synthesevoorbeelden 1-3 een waarde voor ED<sub>50</sub> van resp. 9µM, 14µM en 15µM hebben. Twee van de drie verbindingen hebben bovendien een uiterst geringe giftigheid (hoge waarde van CD<sub>50</sub>) zodat hun therapeutische index even groot als die van ddCyd of zelfs beter zal zijn.

Proeven met HIV-2 gaven een zelfde beeld te zien.

## Voorbeeld 2

Effect van diverse toevoegingen op de anti-HIV werking.

De proeven van voorbeeld 1 werden herhaald in tegenwoordigheid van diverse toevoegingen, waarna het effect van deze toevoegingen werd bepaald.

5 In een eerste reeks proeven werden MT-4 cellen ( $10^6$  cellen per ml) gesuspenseerd in een vers kweekmedium zoals genoemd in voorbeeld 1. De suspensie werd geïnfecteerd met 200 CCID<sub>50</sub> aan HIV-1 per ml celsuspensie. Daarna werden 50µl porties van de geïnfecteerde celsuspensie in de holtes van  
10 een testplaat samengebracht met 100µl porties van een geschikte verdunning van een testverbinding en 50µl porties van een medium dat bepaalde toevoegingen bevatte. Na vijf dagen incuberen bij 37°C in een vochtige atmosfeer met beheersing van het CO<sub>2</sub>-gehalte werd het aantal levensvatbare  
15 cellen geteld.

Een tweede reeks proeven, parallel aan de eerste, werd uitgevoerd met niet-geïnfecteerde celculturen, ook hier werd na afloop het aantal levensvatbare cellen geteld. Uit de gevonden waarden werden de waarden van ED<sub>50</sub> en CD<sub>50</sub> berekend,  
20 op dezelfde wijze als in voorbeeld 1.

De gebruikte toevoegingen waren:

dCyd	2'-deoxycytidine
dThd	2'-deoxythymidine
THU	tetrahydrouridine
25 dTHU	2'-deoxytetrahydrouridine

De resultaten, tezamen met die van voorbeeld 1, zijn in Tabel 2 vermeld.

8801210.

Tabel 2

Verbinding	Toevoeging	ED <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CD <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
AzddClCyd	Geen	9	923
	dCyd (1 mM)	> 500	> 500
	dThd (250 $\mu$ M) + dCyd (1 mM)	$\geq$ 500	> 500
	THU (250 $\mu$ g/ml) + dTHU (250 $\mu$ g/ml)	$\geq$ 500	> 500
	dCyd (1 mM) + THU (250 $\mu$ g/ml) +	> 500	> 500
	+dTHU (250 $\mu$ g/ml)		
FddClCyd	Geen	14	> 1000
	dCyd (1 mM)	> 500	> 500
	dThd (250 $\mu$ M) + dCyd (1 mM)	249	> 500
	THU (250 $\mu$ g/ml) + dTHU (250 $\mu$ g/ml)	248	> 500
	dCyd (1 mM) + THU (250 $\mu$ g/ml) +	> 500	> 500
	dTHU (250 $\mu$ g/ml)		
D4ClC	Geen	15	170
	dCyd (1 mM)	> 100	223
	dThd (250 $\mu$ M) + dCyd (1 mM)	> 100	211
	THU (250 $\mu$ g/ml) + dTHU (250 $\mu$ g/ml)	> 100	220
	dCyd (1 mM) + THU (250 $\mu$ g/ml) +	> 100	213
	dTHU (250 $\mu$ g/ml)		
ddCyd	Geen	0,27	39
	dCyd (1 mM)	56	> 500
	dThd (250 $\mu$ M) + dCyd (1 mM)	14	> 500
	THU (250 $\mu$ g/ml) + dTHU (250 $\mu$ g/ml)	14	> 500
	dCyd (1 mM) + THU (250 $\mu$ g/ml) +	424	> 500
	dTHU (250 $\mu$ g/ml)		
AzddThd	Geen	0,002	5,2
	dCyd (1 mM)	0,07	>>100
	dThd (250 $\mu$ M) + dCyd (1 mM)	0,7	>>100
	THU (250 $\mu$ g/ml) + dTHU (250 $\mu$ g/ml)	0,002	4,3
	dCyd (1 mM) + THU (250 $\mu$ g/ml) +	0,002	40
	dTHU (250 $\mu$ g/ml)		

Uit tabel 2 blijkt dat de toevoeging van 1000  $\mu\text{M}$  dCyd resulteerde in een duidelijke teruggang van de anti-HIV activiteit van de verbindingen uit de synthesevoorbeelden 1-3. Een soortgelijke teruggang trad ook op bij toevoeging 5 van THU + dTHU en van dCyd+THU-dTHU.

In dit opzicht waren de verbindingen van de synthesevoorbeelden vergelijkbaar met ddCyd oftewel 2',3'-dideoxycytidine. Daarentegen zijn de resultaten niet vergelijkbaar met die van azidothymidine, waar een toevoeging van dCyd of 10 van dCyd + dThd wel een teruggang in anti-HIV activiteit tengevolge heeft, maar een toevoeging van THU+dTHU, of van THU+dTHU+dCyd geen effect heeft.

Verder blijkt dat de cytostatische activiteit van de verbindingen uit de synthesevoorbeelden 1 en 2 door de 15 toevoegingen aanzienlijk worden verminderd, evenals bij 2',3'-dideoxycytidine, terwijl de verbinding van synthesevoorbeeld 3 hier een afwijkend gedrag vertoont.

### Voorbeeld 3

20 Remming van Moloney murine sarcoma virus (MSV).

De testverbindingen werden gewaardeerd op hun remmend effect op de transformatie van C3H muizenembryofibroblasten door Moloney murine sarcoma virus (MSV).

C3H cellen werden in een dosis van 20000 cellen per 25 ml in de holtes van een testplaat met 48 holtes gebracht. Na 24 uren werden de celkweken geïnfecteerd met 80 focusvormende eenheden MSV en 120 minuten later werd het kweekmedium vervangen door 1 ml vers medium dat uiteenlopende concentraties van testverbindingen bevatte. Na zes dagen werd de transfor- 30 matie van de celkweken microscopisch waargenomen.

Uit de proeven bleek dat geen van de verbindingen uit de synthesevoorbeelden 1-3 enige antivirale werking bij concentraties tot 1000  $\mu\text{M}$  vertoonde. Daarentegen werd de transformatie door AzddThd doeltreffend geremd ( $\text{ED}_{50}=0,027\mu\text{M}$ ) 35 terwijl ddCyd een  $\text{ED}_{50}$  van 10  $\mu\text{M}$  vertoonde.

C O N C L U S I E S .

1. Verbinding gekozen uit de groep van 5-halogeno-3'-azido-2',3'-dideoxycytidine, 5-halogeno-3'-fluor-2',3'-dideoxycytidine en 5-halogeno-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxycytidine.
5. 2. 5-chloro-3'-azido-2',3'-dideoxycytidine.  
3. 5-chloro-3'-fluor-2',3'-dideoxycytidine.  
4. 5-chloro-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxycytidine.  
5. Farmaceutisch preparaat ten gebruike bij het behandelen van retrovirusinfecties, welk preparaat een ver-  
10 binding uit de groep van 5-halogeno-3'-azido-2',3'-dideoxycytidine, 5-halogeno-3'-fluor-2',3'-dideoxycytidine en 5-halogeno-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxycytidine als actief bestanddeel bevat.
6. Farmaceutisch preparaat volgens conclusie 5,  
15 welk preparaat het actieve bestanddeel in een concentratie tussen ca. 0,1 en ca. 100 gewichts% bevat.
7. Farmaceutisch preparaat volgens conclusie 5, welk preparaat de vorm heeft van een poeder, suspensie, oplossing, spray, emulsie, zalf of crème.
- 20 8. Farmaceutisch preparaat ten gebruike bij het behandelen van AIDS of met AIDS verwante ziekten welk preparaat een verbinding uit de groep van 5-halogeno-3'-azido-2',3'-dideoxycytidine, 5-halogeno-3'-fluor-2',3'-dideoxycytidine en 5-halogeno-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxycytidine  
25 als actief bestanddeel bevat.
9. Farmaceutisch preparaat volgens conclusie 8, welk preparaat het actieve bestanddeel in een concentratie tussen ca. 0,1 en ca. 100 gewichts% bevat.
10. Farmaceutisch preparaat volgens conclusie 8,  
30 welk preparaat de vorm heeft van een poeder, suspensie, oplossing, spray, emulsie, zalf of crème.
11. Werkwijze voor het behandelen van retrovirusinfecties, welke hierin bestaat dat men een verbinding uit de groep van 5-halogeno-3'-azido-2',3'-dideoxycytidine, 5-halogeno-3'-fluor-2',3'-dideoxycytidine en 5-halogeno-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxycytidine toedient aan een patient lijdende  
35 aan een retrovirusinfectie.

12. Werkwijze voor het behandelen van AIDS of een met AIDS verwante ziekte, welke hierin bestaat dat men een verbinding uit de groep van 5-halogeno-3'-azido-2',3'-dideoxycytidine, 5-halogeno-3'-fluor-2',3'-dideoxycytidine en 5 5-halogeno-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxycytidine toedient aan een patient lijdende aan AIDS of een met AIDS verwante ziekte.

13. Toepassing van een verbinding gekozen uit de groep van 5-halogeno-3'-azido-2',3'-dideoxycytidine, 5-halogeno-3'-fluor-2',3'-dideoxycytidine en 5-halogeno-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxycytidine voor het bereiden van een farmaceutisch preparaat tegen retrovirusinfekties en hepatitis B.

14. Toepassing van een verbinding, gekozen uit de groep van 5-halogeno-3'-azido-2',3'-dideoxycytidine, 5-halogeno-3'-fluor-2',3'-dideoxycytidine en 5-halogeno-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxycytidine voor het bereiden van een farmaceutisch preparaat tegen AIDS en met AIDS verwante ziekten.

-----

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**